R. UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
R. OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

198

AUG 1946

O. VERONA

Qualche osservazione sulla fase "R,, di *Bact. tumefaciens* Smith et Townsend

Estratto dagli ANNALI DELLA FACOLTÀ DI AGRARIA
NUOVA SERIE VOLUME IV (XLII DALLA FONDAZIONE)
1941 - XIX

PREMIATO STABILIMENTO TIPOGRAFICO GIUSEPPE CURSI & FIGLI — PISA — 1941 XIX

O. VERONA

QUALCHE OSSERVAZIONE SULLA FASE " R „ DI *BACT. TUMEFACIENS* SMITH ET TOWNSEND

RIASSUNTO – Ottenuta la fase " R „ di *Bact. tumefaciens* a mezzo di colture su agar carne addizionato di sali di litio, ne sono state studiate le proprietà in rapporto alla fase " S „ risultando che esistono evidenti differenze nel comportamento delle due fasi, sia nei riguardi colturali che in quelli di virulenza.

RESUMÉ - Ayant obtenu la phase " R „ du *Bact. tumefaciens* moyennant cultures sur gèlose de bouillon de viande traitée avec les sels de lithium, on en a étudié les propriétés en rapport avec la phasé " S „: il en résulte qu' il existe des différences évidentes dans la conduite des deux phases, soit pour ce qui regarde les cultures, soit pour ce qui regarde la virulence.

ZUSAMMENFASSUNG - Nachdem man die Phase " R „ des *Bact. tumefaciens* durch Kulturen auf Fleichagar dem Lithiumsalz hinzgefügt war, erhalten hatte, wurden die Eigentümlichkeiten derselben in Beziehung zur Phase " S „ studiert, wobei sich ergab, dass deutliche Unterschiede in dem Verhalten der beiden Phasen bestehen, sowohl in Bezug auf die Kulturen wie auf die Virulenz.

SUMMARY - The " R „ phase of " *Bact. tumefaciens* „ having been obtained by means of cultivating agaric-flesh treated vith salts of lithium, the properties of these with the " S „ phase have been studied, and as a result it appears that evident differences exist in the behaviour of the two phases, whether with regard to culture or to virulence.

Contro la considerevole mole di lavori comparsi, in questi ultimi anni, sul fenomeno della dissociazione (variazione) nei batteri patogeni per l'uomo e gli animali, stanno appena pochi studi sui batteri fitopatogeni.

Nell'ambito di questi, *Bact. tumefaciens* è stata la specie, forse, un po' meglio studiata.

Levine (1) (2) e Rosen (3) già avevano segnalato variazioni nelle dimensioni e anche nella forma in dipendenza dell'età delle colture, del substrato, ecc., variazioni, tuttavia, non fisse. Kauffman (4) ammette variazioni anche nella mobilità e Link e Hull (5) segnalano la comparsa, in alcuni ceppi, di colonie in fase « R » ed in fase « S-R » rap resentate queste da colonie rugose al centro e liscie alla periferia. Quirk (6), infine, con successivi trapianti in mezzi a differenti pH poté far variare anche il potere patogeno ed ottenere da un unico ceppo colonie virulenti e non virulenti.

Nel corso di alcune esperienze sull'azione biologica dei sali di litio essendoci capitato di osservare fenomeni dissociativi in un ceppo virulento di *Bact. tumefaciens* abbiamo voluto eseguire qualche ricerca al fine di porre in rilievo eventuali differenze di comportamento tra il ceppo normale e quelli dissociati o in via di dissociazione.

Questi comparsero in colture su agar-carne addizionato o meno di cloruro, nitrato e solfato di litio aggiunto in quantità comprese tra lo 0.05 e lo 0.5% in elemento. Le quantità percentuali di sali aggiunte al substrato risultano dall' annesso prospetto ove trovasi fissato anche lo sviluppo presentato dal batterio.

A parte ogni considerazione sulla maggiore o minore tolleranza presentata da *Bact. tumefaciens* di fronte a dosi diverse di sali di litio, rispetto alla loro natura ed in confronto ad altre specie, ciò che qui volevamo segnalare è dunque la comparsa, nei ceppi coltivati in presenza di sali, di modificazioni culturali che subito interpretammo come indice di fatti dissociativi.

Infatti, mentre in agar-carne le patine si presentano liscie, mucose, elevate, translucide, semitrasparenti e con orlo continuo, negli agar carne-litio l'aspetto di modifica e le vegetazioni appaiono più o meno finemente rugose, secche, piatte, con orlo sinuoso-lobato.

Già il carattere della rugosità dava ragione di ritenere i ceppi coltivati in presenza di litio come ceppi in via di variazione; comunque, la reazione di agglutinazione aspecifica a mezzo della tri-

Sviluppo di *B. tumefaciens* in agar-carne contenente quantità variabili di sali di litio [I segni + indicano l'intensità di sviluppo].

Sale aggiunto	% di elemento	% di sale	sviluppo
Controllo			+++++
Cloruro	0.05	0.3050	+++++
	0.10	0.6109	+++++
	0.25	1.5273	++++±
	0.50	3.0547	—
Nitrato	0.05	0.4960	+++++
	0.10	0.9933	+++++
	0.25	2.4833	—
	0.50	4.9667	—
Solfato	0.05	0.7920	+++++
	0.10	1.5849	+++++
	0.25	3.9600	+++
	0.50	7.9200	—

paflavina, ce ne dette la certezza (1) ancorchè nessuna notevole differenza morfologica apparisse evidente, rispetto al controllo, all'esame microscopico.

(1) E' ormai accertato in modo non dubbio — già dai primi studi di Pampana [E. Pampana: Boll. Sez. It. d. Soc. Int. di Microb. 1931] che ha sperimentato con il gruppo tipo-paratifi-dissenterici — come l'agglutinazione aspecifica con tripaflavina costituisca un mezzo di determinazione della fase " R „ o di quei ceppi che tendono ed essa pur senza averne ancora acquistato i caratteri morfologici.

Con le varianti ottenute passando il germe, quattro volte consecutive alla distanza di 15 giorni, su agar-carne contenente, in elemento, lo 0,25% di cloruro, lo 0,1% di nitrato e lo 0,25% di solfato, eseguimmo alcune ricerche al fine di fissare i principali caratteri differenziali rispetto ai ceppi non dissociati.

Ceppi di *Bact. tumefaciens* in vario grado di dissociazione; a sinistra, in centro, a destra, in presenza, rispettivamente, dello 0,05% di Li sotto forma di cloruro, dello 0,10% di Li sotto forma di nitrato e dello 0,25% di Li sotto forma di solfato: quest'ultimo al quarto passaggio.

Fig. 1

Per quanto, anzitutto, si riferisce ai caratteri delle vegetazioni già in parte si è detto. La rugosità, che costituisce il segno più espressivo della fase «R» nel senso indicato da Arkwright, non appare in modo evidentissimo ed è, per quanto abbiamo potuto constatare, preceduta dall' agglutinazione con tripaflavina. Le patine, verosimilmente, in quanto in condizioni ottime e normali di sviluppo si presentano rilevate, mucose, umide e sempre omogeneamente isce, debbono passare allo stato secco e rugose con alquanta len-

tezza. Prima della rugosità la patina comunque si appiattisce e si fa secca.

Nelle colture in brodo peptone la forma «S» intorbida leggermente ed omogeneamente e forma una sottile pellicola ricadente all'agitazione; la forma «R» da ancora leggero intorbidamento ma in superficie lo sviluppo si limita alla formazione di un anello più o meno continuo senza formare velo.

In agar-carne fenicato la forma «S» sviluppa abbastanza bene anche alla concentrazione dell'1‰, mentre la forma «R» sviluppa stentatamente o affatto. Infatti:

Sviluppo di *Bact. tumefaciens* in fase "S„ ed "R„ in agar-carne fenicato

Controllo		Ceppo "S„	Ceppo "R„ 1	Ceppo "R„ 2	Ceppo "R„ 3
‰ di acido fenico	0.5	+++++	+++++	+++++	+++++
	0.75	+++++	+++++	++++	+++++
	1 —	+++++	++	—	++
		+++++	+++++	+++++	+++++

[I ceppi 1, 2, 3, corrispondono, rispettivamente, a quelli ottenuti in agar contenente lo 0,05% in Li del cloruro, lo 0.10% in Li del nitrato e lo 0,25% in Li del solfato].

Alle prove di agglutinazione aspecifica cun soluzione di cloruro di sodio 0.85%, solfato di rame 1% e tripaflavina 1‰ i ceppi in fase «S» non dimostrarono agglutinarsi; i ceppi in fase «R», invece, se presentarono una agglutinazione modesta nella soluzione di cloruro di sodio, agglutinarono in modo evidente nelle soluzioni di solfato di rame e, sopratutto, di tripaflavina.

Rispetto alle comuni colorazioni con i colori di anilina i ceppi

in fase «R» sembra che tendano ad assumere meno bene il colore. Rispetto alla prova di Gram, eseguita colorando intensamente il preparato con violetto di genziana anilinico e liquido di Lugol e quindi decolorando in alcool a 95, i ceppi in fase «R» mostrarono decolorarsi completamente dopo 20 secondi di contatto con l'alcool mentre il ceppo in fase «S» dopo 30 secondi si mostrava decolorato solo parzialmente. La fase «S» si presenta quindi un poco più resistente alla decolororazione.

Un ultimo carattere differenziale fu ricercato nella variazione di virulenza che non è stata sufficientemente studiata, a quanto ci consta, in rapporto alle due fasi «S» ed «R» (1),

Per questo abbiamo preparato diverse serie di piante di Ricino coltivate in vasi contenenti sabbia di fiume. I semi di Ricino furono interrati il 30-IV-1941 e l'inoculazione delle piantine, praticata a mezzo di puntura con ago, ebbe luogo il 16-5-1941. L'inoculazione fu eseguita su quaranta piantine a metà, con il ceppo "S„ e a metà con il ceppo «R» 3 ottenuto da colture in agar-carne al solfato di litio con lo 0,25 % in elemento.

Lo sviluppo delle piantine fu normale e i risultati conseguiti furono i seguenti:

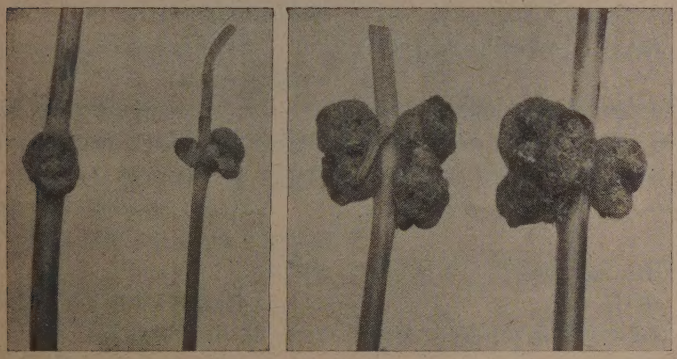
1) nelle piantine inoculate con il ceppo «S» lo sviluppo dei tumori fu del 100% ;

---

(1) – Variazioni di virulenza, in *B. t.*, sono note. Quirk, come già si è ricordato, (6) ha ottenuto ceppi non virulenti per mezzo di successivi trapianti in mezzi di differente pH. Ceppi virulenti e non virulenti furono distinti anche da Patel (7) (8) e da Lyneis, Riker e Locke (9).

Berge, Riker e Baldwin (10) correlazionano la virulenza alla viscosità delle colture e Riker, van Lanen e Baldwin (11) affermano che tale virulenza si attenua per aggiunte al substrato dello 0.1-0.3 % di glucinao sostanze affini.

2) nelle piantine inoculate con il ceppo « R» i tumori si svi lupparono solo su quattro piantine solo cioè per il 20% e comunque questi tumori si presentarono singolarmente più piccoli rispetto agli altri.



A sinistra, due dei quattro tumori sviluppati a seguito dell'inoculazione del ceppo "R„ ; a destra, tumori ottenuti con il ceppo "S„.

Il ceppo in fase "R„ dimostrò quindi una notevole diminuzione di virulenza ; d'altronde, il fatto concorda con quanto è noto per la maggior parte dei batteri patogeni per l'uomo.

Riassumendo, mentre dalle ricordate esperienze emerge, incidentalmente, a conferma di precedenti osservazioni, l'azione dissociante del litio, risulta ancora provata per *Bact. tumefaciens* la capacità di produrre ceppi in fase "R„. E, conforme quanto è stato indagato, le differenze tra questi e quelli in fase «S» possono così comparativamente fissarsi :

Fase "S"	Fase "R"
— Nelle colture liquide intorbidamento leggero e omogeneo e formazione di sottile pellicola.	— Nelle colture liquide intorbidamento e, in superficie, formazione di anello e non di velo.
— Negli agar colonie liscie, mucose, rilevate, abbondanti, ad orlo continuo.	— Negli agar colonie più o meno rugose, secche, non rilevate, ad orlo sinuoso-lobato.
— Notevole produzione di sostanze mucose.	— Scarsa o assente produzione di sostanze mucose.
— In agar-carne fenicato sviluppo anche in presenza dell'1 % del composto	— In agar-carne fenicato sviluppo stentato o ritardato o nullo in presenza dell'1‰ del composto.
— Sospensione normale in soluzioni di Na Cl allo 0,85 % e di $Cu SO_4$ all'1 %.	— Leggera agglutinazione nelle soluzioni di Na Cl allo 0.35 % e di $Cu SO_4$ all'1 %.
— Non agglutinabile con la tripaflavina all'1‰.	— Agglutinazione evidente in presenza di tripaflavina 1‰.
— Più resistente alla decolorazione secondo Gram.	— Meno resistente alla prova di Gram
— Notevolmente virulento.	— Poco o punto virulento.

Le varianti ottenute in agar-litio non si dimostrarono fisse. Passati infatti i ceppi in fase "R" su agar-carne normale le patine non tardarono a ritornare liscie riprendendo in pieno i caratteri propri della fase «S».

Pisa, Facoltà di Agraria della R. Università
Istituto di Patologia Vegetale e Microbiologia agraria e tecnica.